



SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CONTENDO COMPLEXOS DE Au(I) BIOATIVOS

Palavras chave: Albumina; Ouro; Nanopartículas; Antiparasitários.

Matheus de Lucena Facione Pereira - Faculdade de Engenharia Química - Unicamp

Otávio Luiz dos Reis- Instituto de Química - Unicamp

Profa. Dra. Camilla Abbehausen - Instituto de Química - Unicamp

1. Introdução

As propriedades medicinais do ouro estão presentes na história humana há muito, porém, com a aprovação clínica dos tiolatos de ouro e da auranofina a partir de 1978, o conhecimento sobre sua toxicidade e atividade biológica se ampliaram abrindo possibilidades de outras aplicações e o desenvolvimento de outros complexos para aplicações farmacológicas. Porém, um grande empecilho no uso deste metal como fármaco está em efeitos colaterais decorrentes de uma não especificidade de ação e especiação dele em meios complexos como o plasma sanguíneo^[1].

A fim de encontrar alternativas que melhores a farmacodinâmica, farmacocinética e biodisponibilidade de complexos de Au(I), este projeto visou desenvolver um método de encapsulamento do complexo de Au(I)(IMes)Cl (IMes = <1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-imidazólio>), que apresenta atividade farmacológicas reportada e estudada por nosso grupo de pesquisas, em nanopartículas esféricas de albumina pelo método da dessolvatação^[2]. A albumina sérica bovina (BSA), proteína utilizada, é uma excelente carregadora por possuir diversos sítios de ligação, os quais se ligam a diversas espécies de compostos. Ainda, a BSA possui funções auxiliares como reguladora oncótica e antioxidante, logo, espera-se que seu uso não possua efeitos adversos, considerando que é a proteína sérica presente em maior quantidade nos seres humanos^[3,4].

As nanopartículas (nnps) de albumina foram sintetizadas a fim de encapsular complexos de Au(I), desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, com potencial aplicações antitumorais, antiparasitários e antivirais. Os complexos utilizados foram o [Au(I)IMesCl] e o [Au(I)IMesSbtz] (Figura 2). Baseadas nas características mencionadas da proteína, objetiva-se a diminuição dos efeitos de trocas de ligantes no sangue, além de minimizar os efeitos colaterais dos metalofármacos no corpo devido a elevada toxicidade e ação não específica. Para o caso de tratamento antitumoral, espera-se também que a albumina seja direcionada a zonas específicas para liberação do fármaco e isto ocorre pela alta atividade metabólica de células cancerígenas e sua reprodução.

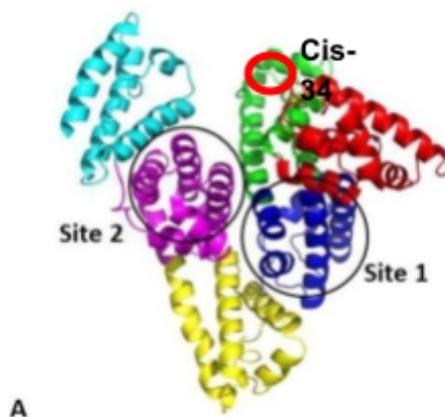


Figura 1 - Estrutura da albumina com seus domínios representados, destacando os sítios de ligação 1 e 2, e a posição da Cis-34 ^[5].

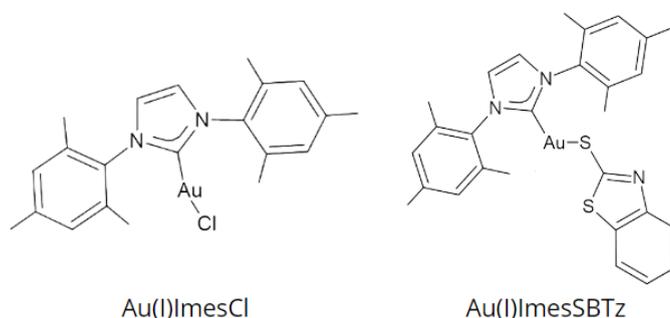


Figura 2 - Complexos metálicos encapsulados nas nanopartículas

2. Metodologia

Síntese do AuIMesCl

A síntese do AuIMesCl seguiu o procedimento utilizado em [6].

Síntese dos AuIMesSBTz

A síntese foi realizada adicionando 0,06 mmol de 2-mercaptobenzotiazol (HSBTz) e 0,06 mmol de metóxido de sódio à um balão com 5,0 mL de metanol. Então, à solução formada adicionou-se 0,06 mmol do complexo [Au(I)IMesCl]. A reação foi mantida sob agitação constante por 2 horas, protegida da luz. Após isso o MeOH é removido da solução em pressão reduzida e adicionou-se 5 mL de diclorometano ao balão, formando uma suspensão filtrada com auxílio de filtro de seringa. A solução teve seu volume reduzido e então foi adicionado éter etílico para precipitação do complexo, obtendo-se um sólido incolor e cristalino, seco sob vácuo.

Síntese das nanopartículas

Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa de NaCl de 10 mmol L⁻¹, em seguida, solubilizou-se 50 mg de albumina em 2 mL dessa solução. Após a completa dissolução da albumina, adiciona-se pequenas quantidades de solução de hidróxido de sódio, a fim de manter o pH na faixa de 9 a 10. Em seguida, para as partículas carregadas de complexo, utilizando-se um béquer separado, preparou-se uma solução de 5 mg do complexo em 8 mL de acetona P.A. Já para as não carregadas,

utilizou-se somente 8 mL de acetona. Nesta metodologia, a acetona tem um papel de “dissolvente” e será chamada assim. Em seguida, após a total dissolução dos sólidos nos béqueres, a solução de dissolvente é adicionada na solução aquosa com vazão aproximada de 1 mL/min sob agitação. Ao fim da adição de dissolvente, realiza-se 10 adições de 3 μ L de solução de glutaraldeído 8% à mistura, o qual age como cross-linker, então é tampada e mantida sob agitação por 24 horas^[7]. Ao fim do tempo de reação, os produtos são purificados em três ciclos de centrifugação de 10000 rpm, temperatura ambiente. O sobrenadante é descartado e substituído por 2 mL de água milli-Q.

Após a purificação das nnps, foram realizadas medidas de tamanho, polidispersividade e potencial zeta (utilizado para medir estabilidade). Tais dados foram obtidos com o uso do equipamento Zetasizer Nano ZS-Zen3600. Já o complexo encapsulado nas partículas foi medido por um indutor de plasma (ICP-OES) Perkin-Elmer modelo Optima 8300.

3. Resultados

Tabela 1 - Efeitos observados no tamanho de partícula (nm), polidispersividade, potencial zeta (mV) e proporção de complexo encapsulado em relação ao utilizado inicialmente (m/m%) obtidos em nanopartículas de albuminas carregadas de AuIMesCl. A síntese padrão (p) é a descrita na metodologia e as alterações realizadas foram (a) Diminuição da concentração de albumina, 05x em relação à padrão. (b) Redução de volume de glutaraldeído em 0,5x em relação à padrão. (c) Aumento da concentração de glutaraldeído em 6,25x em relação à padrão. (d) Dissolvente formado por uma solução de 37,5% etanol e 62,5% acetona.

	Tamanhos de partícula (nm)	Polidispersividade de	Potencial Zeta (mV)	Quantidade de complexo encapsulado (%)
Síntese padrão de partículas carregadas - (p)	676,0	0,747	-35,0	1,34
Metade da concentração de albumina:complexo - (a)	206,6	0,132	-15,6	0,61
Metade do volume de glutaraldeído - (b)	226,6	0,056	-47,3	1,21

Aumento quantidade de glutaraldeído - (c)	196,1	0,067	-23,1	12,8
Dessolvente EtOH+Acetona 6:10 - (d)	265,1	0,212	-36,3	0,27

Tabela 2 - Efeitos observados no tamanho (nm), polidispersividade e potencial zeta (mV) obtidos em nanopartículas de albuminas carregadas de AuIMesSBTz. A síntese padrão é a descrita na metodologia e as alterações realizadas foram (b) Redução de volume de glutaraldeído em 0,5x em relação à padrão, as medidas desta amostra foram passadas em vórtex, ultrassom e por um filtro de seringa devido à aglutinação que ocorre naturalmente.

	Tamanhos obtidos (nm)	Polidispersividade	Estabilidade obtida (mV)
Síntese padrão de partículas carregadas - (e)	337,1	0,388	-32,1
Metade do volume de glutaraldeído - (f)	204,5	0,098	-37,9

4. Discussão

Para definir quais as nanopartículas mais propensas a desenvolverem atividade farmacológica foram definidas aquelas que possuem uma boa intersecção entre menores tamanhos, elevada estabilidade (medida através do potencial zeta) e menor polidispersividade (PDI) aliada à quantidade de complexo encapsulado. Apesar de possuir uma única característica que atenda às desejadas, escolhe-se as que possuírem melhores correlações entre estes dados.

A priori, para o complexo AuIMesCl, através da comparação dos tamanhos é evidente que com a redução do volume de glutaraldeído, obtêm-se a melhor correlação entre tamanho e potencial zeta, ou seja, são as partículas de menor tamanho com maior estabilidade para evitar aglutinação. Verificando-se a quantidade de ouro armazenado nas nnps percebe-se que estas partículas, **a**, são as que atendem a melhor correlação dos dados obtidos e por isso espera-se uma atividade biológica razoável, além de conseguirem ser metabolizadas pelo organismo.

O segundo método mais eficiente observado foi a síntese utilizada como base, ou seja, a síntese padrão, **p**. Isso, pois, apesar de ser a maior, foi a única outra que possui uma correlação

aceitável entre potencial zeta e quantidade de complexo encapsulado. Acredita-se que este último seja obtido exatamente devido ao maior tamanho das nnps e possível encapsulamento mecânico.

Inicialmente, para o complexo AuMesSBTz, nnps sintetizadas com este metalofármaco foram sintetizadas e analisadas. Com isso observou-se que o comportamento de tamanho, potencial zeta e PDI delas é muito semelhante e isto é possivelmente devido às suas semelhanças estruturais. Devido este motivo e a limitação do período do projeto, para o complexo AuMesSBTz foram sintetizadas somente nanopartículas com maior propensão de possuírem atividade biológica, considerando todas as características analisadas, sendo elas procedimentos análogos à **p** e **b** e obter os compostos para futuros testes biológicos. Para a amostra **e**, na ausência do procedimento realizado devido à aglutinação, espera-se que o tamanho desta seja mais próximo da amostra **p**, e isso será verificado com as replicatas finais.

Com a análise dos dados obtidos, fica evidente que a síntese das nnps de albumina para metalofármacos são possíveis de serem realizadas e o melhor método é 50 mg de albumina, 5 mg, de complexo e 30 µL de glutaraldeído por possuírem melhor relação de tamanho, potencial zeta e carregamento de Au(I). Essas partículas ainda serão caracterizadas por microscopia e análises biológicas in vitro serão realizadas.

5. Referências bibliográficas

1. LOUFOUMA MBOUAKA, A. et al. Antimicrobial effect of auranofin against *Acanthamoeba* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 5, p. 106425, nov. 2021.
2. KAYANI, Z.; FIRUZI, O.; BORDBAR, A.; Doughnut-shaped bovine serum albumin nanoparticles loaded with doxorubicin for overcoming multidrug-resistant in cancer cells. *International journal of biological Macromolecules*. v.107, p. 1835-1843, out. 2019.
3. MERLINO, Antonello. Metallodrug binding to serum albumin: lessons from biophysical and structural studies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 480, p. 215026, abr. 2023.
4. CARTER, Daniel C.; HO, Joseph X.. Structure of Serum Albumin. **Lipoproteins, Apolipoproteins, And Lipases**, [S.L.], p. 153-203, 1994.
5. SPADA, Alessandra; EMAMI, Jaber; TUSZYNSKI, Jack A.; LAVASANIFAR, Afsaneh. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 1862-1894, 31 mar. 2021
6. VISBAL, Renso; LAGUNA, Antonio; GIMENO, M. Concepción. Simple and efficient synthesis of [MCl(NHC)] (M = Au, Ag) complexes. **Chemical Communications**, [S.L.], v. 49, n. 50, p. 5642, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cc42919a>.
7. TIWARI, Rahul; VISWANATHAN, Kaliyaperumal; GOUR, Vishal; VYAS, Suresh Prasad; SONI, Vandana. Cisplatin-loaded albumin nanoparticle and study their internalization effect by using β -cyclodextrin. *Journal Of Receptors And Signal Transduction*, v. 41, n. 4, p. 393-400, 9 set. 2020.